

19 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

12 Offenlegungsschrift  
10 DE 43 25 699 A 1

51 Int. Cl.<sup>8</sup>:  
C 12 N 15/62  
C 12 N 5/16  
C 12 Q 1/02  
// C 12N 15/56, 15/12

21 Aktenzeichen: P 43 25 699.6  
22 Anmeldetag: 30. 7. 93  
43 Offenlegungstag: 2. 2. 95

DE 43 25 699 A 1

71 Anmelder:  
Berns, Hartmut, 44627 Herne, DE

74 Vertreter:  
Herrmann-Trentepohl, W., Dipl.-Ing., 44623 Herne;  
Kirschner, K., Dipl.-Phys.; Grosse, W., Dipl.-Ing.;  
Bockhorni, J., Dipl.-Ing., 81476 München; Thiel, C.,  
Dipl.-Chem. Dr. rer. nat., Pat. Anwälte, 44623 Herne

72 Erfinder:  
Berns, Hartmut, 44627 Herne, DE; Heumann, Rolf,  
Prof. Dr., 44801 Bochum, DE

54 Rekombinantes DNA-Konstrukt

57 Rekombiniertes, neuronalspezifisch aktiviertes, transkribierbares, lineares DNA-Konstrukt mit einem neuronalspezifischen DNA-Kontrollelement zur Transcriptionsinitiation eines in 3'-Richtung stromabwärts befindlichen Strukturgens; einem transkribierbaren, eukaryotischen Struktur-On-kogen, das in 3'-Richtung stromabwärts zum neuronalspezifischen DNA-Kontrollelement eingefügt ist, und ggf. einem in 3'-Richtung stromabwärts des Strukturgens eingefügten Konstrukt, bestehend aus einem transkribierbaren Reportergen, gekoppelt mit einem in 5'-Richtung stromaufwärts eingefügten DNA Fragment, das für eine interne Ribosomenbindungsstelle (IRES) kodiert.

DE 43 25 699 A 1

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein rekombiniertes DNA-Konstrukt und insbesondere ein neuronalspezifisch aktiviertes, transkribierbares DNA-Konstrukt, neuronale Zellen, die ein solches Konstrukt enthalten sowie die Verwendung dieses Konstrukts und solcher Zellen zum Testen von Wirkstoffen.

Die Herstellung eines rekombinierten, heterologen DNA-Fragments zur Einbringung in das Genom eines prokaryontischen und auch eukaryontischen Organismus unter Produktion von Transgenizität ist bekannt.

So beschreibt beispielsweise EP-OS 0 169 672 ein Verfahren zur Produktion eines transgenen, nichthumanen Säugetiers mit erhöhter Wahrscheinlichkeit der Entwicklung von Neoplasmen durch chromosomatische Einbringung einer aktivierten Onkogenesequenz in das Genom eines nichthumanen Säugetiers.

Die Erforschung von Nervenzellen war der Untersuchung mit DNA-Rekombinationsverfahren und anderen molekulargenetischen Verfahren bisher nur eingeschränkt zugänglich. So beschränkten sich die Untersuchungen auf nur wenige Typen neuronaler Zellen, die kultiviert werden konnten. Biologische Effekte, die man an kultivierten Zellen beobachtet, sind jedoch zu relativieren, da die Untersuchungsobjekte aus ihrer natürlichen Umgebung entfernt wurden und z. B. für Faktoren, die dort vom umliegenden Gewebe auf sie einwirken konnten, nicht mehr zugänglich sind. Somit besteht immer die Notwendigkeit, diese in vitro beobachteten Effekte in vivo zu verifizieren.

Das besondere Problem der Einbringung eines rekombinanten, ein Strukturgen enthaltenden DNA-Fragmentes in das Genom eines eukaryontischen Organismus zur Untersuchung seiner Wirkung auf Nervenzellen besteht darin, daß die Expression des Proteinprodukts des Strukturgens möglichst spezifisch zu erfolgen hat, so daß hiervon nur Nervenzellen betroffen werden. Diese hochspezifische Kontrolle der Expression von DNA-Genprodukten in Nervenzellen war nach dem Stand der Technik bisher weder qualitativ noch quantitativ zufriedenstellend.

Ein weiteres Problem bei der Erforschung der Genexpression in Nervenzellen besteht darin, daß die Mechanismen der Genexpression im Nervensystem besonders komplex sind, da dieses aus vielen Unterarten von neuronalen Zellen besteht, die während ihrer Entwicklung und ihrer Differenzierung komplizierte Wechselwirkungen eingehen. Man vermutet dabei, daß Änderungen der Expressionsrate einiger neuronaler Gene mit der Informationsverarbeitung und -speicherung des Nervensystems zusammenhängen.

In neuronalen Zellen spielen die Ras-Proteine eine zentrale Rolle. Sie sind in der Lage Guanosintriphosphat (GTP) zu binden. Gebundenes GTP kann dann durch GTPase-Aktivitäten zu Guanosindiphosphat (GDP) und anorganischem Phosphat ( $P_i$ ) hydrolysiert werden. GDP kann im Anschluß durch einen Austauschfaktor vom Ras-Protein getrennt und wieder gegen GTP ausgetauscht werden. Durch die intrazelluläre Feinabstimmung der GTPase-Aktivitäten und des Austauschfaktors wird das Verhältnis von Ras/GTP zu Ras/GDP in der Zelle exakt reguliert.

Ras/GTP kann als aktiviertes Ras im Gegensatz zu Ras/GDP als inaktiviertes Ras bezeichnet werden. Ein inaktiviertes Ras-Protein führt zu einer Unterexpression von Neurotrophinen, die für das Überleben von Neuronen notwendig sind. Ein Neuron, das keine Neurotrophine erhält, stirbt ab. Ein Neuron, das eine Überexpression von Neurotrophinen erhält, überlebt länger als ein Neuron, das eine normale Expression erhält. Ein Neuron, das eine Überexpression von Neurotrophinen erhält, überlebt länger als ein Neuron, das eine normale Expression erhält.

(neurotrophes Signal) weiterleiten, das Neuronen am Absterben hindert. Dieses Überlebenssignal wird von außen an das Neuron durch neurotrophe Faktoren (z. B. NGF = Nerve Growth Faktor) herangetragen und über Tyrosinkinase-Rezeptoren durch die Zellmembran ins Zellinnere von neuronalen Zellen weitergeleitet. Hier stimuliert es den Austauschfaktor und erhöht damit der Ras/GTP-Anteil, wodurch das neurotrophe Signal weitergeleitet wird.

Insbesondere bei der Untersuchung des Einflusses von aktiviertem Ras-Protein auf Nervenzellen wurde nicht mit ras-DNA, sondern mit Ras-Protein gearbeitet, das von außen nur in einen Bruchteil der Neuronen einzubringen war. Bisher war es nicht möglich, eine Population von Neuronen zu erzeugen, die das aktive ras-Strukturgen homogen in ihrem Genom integriert haben und dieses konstitutiv exprimieren.

Bei der Untersuchung der Wirkung von aktiviertem Ras-Protein auf verschiedene Zelltypen wurde ferner festgestellt, daß dieses zusammen mit anderen Induktoren viele nichtneuronale Zellen zur Transformation und damit zur unkontrollierten Proliferation anregen kann. Dies wäre bei stabiler genomischer ras-DNA-Integration für das heranwachsende Tier lethal, so daß die neuronale Spezifität der Ras-Expression für das Überleben eines transgenen Tieres, wie vorstehend erwähnt, essentiell ist.

Da exprimierte Ras-Proteine, wie vorstehend angedeutet, auch eine wichtige Rolle bei der Tumorentwicklung spielen, wurde ihre Entstehung und insbesondere die sie exprimierenden ras-Gene intensiv untersucht. So wurde beispielsweise gefunden, daß der Austausch einer einzigen Base in den ras-Genen von Harvey-(v-Ha-ras) und Kirsten-(v-Ki-ras)-Sarcoma-Virus zu einem Aminosäureaustausch im vom ras-Gen exprimierten Ras-Protein führt (D.J. Capon et al., Nature, Vol. 302, S. 33–37, (1983)). Die so mutierten Produkte führen schließlich zur Zelltransformation und damit zur unkontrollierten Proliferation dieser Zellen, wodurch sich die Tumorbildung manifestiert.

Zur Erforschung der Expressionsspezifität in Nervenzellen wurde das ubiquitäre neuronale Protein Synapsin I kodierende Gen untersucht. Da regulatorische DNA-Sequenzen, die transkriptionale Kontrolle bewirken, oft in den 5'-flankierenden Regionen von Genen gefunden werden, wurden unter Verwendung von klonierter Synapsin I-cDNA (M.W. Kilimann und L.J. DeGennaro, EMBO J., Vol. 4, S. 1997 bis 2002 (1985)) 5'-flankierende Regionen der Synapsin I-Gene von Ratte und Mensch isoliert, deren Nukleotidsequenzen bestimmt, diese einer Restriktionsanalyse unterzogen und so der Ort des Transkriptionsstarts kartiert. Der so von A. Sauerwald et al. gefundene Synapsin I-Promotor (A. Sauerwald et al., J. Biol. Chem., Vol. 265, Nr. 25, S. 14932–14937 (1990)) ermöglicht eine rein neuronale Expression, die sämtliche anderen, verschiedenen Zelltypen eines Säugetieres ausschließt.

Es ist aus dem Stand der Technik bekannt, die Expressionsrate bzw. den Expressionsort von durch rekombinante Gene exprimierten Proteinen durch Kopplung des rekombinanten DNA-Fragmentes mit einem Reporter gen zu bestimmen. Dabei wird das rekombinante DNA-Fragment mit dem Reporter gen so kombiniert, daß dessen Produkt zusammen mit dem Produkt des rekombinanten DNA-Fragmentes eine spezifische Reaktion auslöst, die die Kopplung des rekombinanten DNA-Fragmentes mit dem Reporter gen nachweist. Ein solches System kann zur Untersuchung der Expressionsspezifität von rekombinanten Genen in prokaryontischen, eukaryontischen oder in transgenen Tieren eingesetzt werden. Ein solches System kann zur Untersuchung der Expressionsspezifität von rekombinanten Genen in prokaryontischen, eukaryontischen oder in transgenen Tieren eingesetzt werden.

lung von zu untersuchendem Protein und dem Protein des Reportergens sichtbar macht. Beispielsweise läßt sich das für das prokaryontische Enzym  $\beta$ -Galaktosidase kodierende lacZ-Gen aus *E. coli* mit einem je nach Untersuchungsziel aufgebauten rekombinanten DNA-Fragment kombinieren. Bietet man dem exprimierten Enzym, das am Beginn der Metabolisierung vom Laktose steht, unter definierten Bedingungen ein bestimmtes synthetisches Farbstoffvorläufermolekül (X-Gal) an, so wird dieses zu einem blauen Farbstoff umgesetzt. Diese Blaufärbung zeigt also gleichzeitig die Expression des mit der  $\beta$ -Galaktosidase gekoppelten, zu untersuchenden Proteinprodukts des auf dem rekombinanten DNA-Fragment befindlichen Strukturgens an (A. Kalnins et al., EMBO J. Vol. 2, No. 4, 593 (1983)). Durch die Koexistenz von Struktur- und Reportergen auf ein und demselben Transkript, ermöglicht durch die Ribosomenbindungsstelle, ist eine maximale Koexpression möglich.

Jedoch war es bisher nicht möglich, heterologe DNA herzustellen, in der ein beliebiges DNA-Strukturgen unter Kontrolle eines geeigneten Promotors neuronalspezifisch transkribiert und dessen Proteinprodukt in vivo konstitutiv exprimiert wird. Dabei wäre insbesondere die Kombination eines neuronalspezifischen Promotors mit einem Struktur-Onkogen nützlich, die bei der Erforschung des Mechanismus und der Beeinflussung neurodegenerativer Erkrankungen helfen könnte.

Es ist daher Aufgabe der Erfindung ein neuronalspezifisch aktiviertes DNA-Konstrukt mit transkribierbarer Sequenz eines Strukturonkogens zur Einbringung in das Genom eines nichthumanen Säugetieres zur Verfügung zu stellen.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe mit einem DNA-Konstrukt gelöst, das ein neuronalspezifisches DNA-Kontrollelement zur Transkriptionsinitiation eines in 3'-Richtung stromabwärts befindlichen Strukturgens, ein transkribierbares, eukaryotisches Struktur-Onkogen, das in 3'-Richtung stromabwärts zum neuronalspezifischen DNA-Kontrollelement eingefügt ist, und ggf. ein in 3'-Richtung stromabwärts des Strukturgens eingefügtes Konstrukt, bestehend aus einem transkribierbaren Reportergen, gekoppelt mit einem in 5'-Richtung stromaufwärts eingefügten DNA-Fragment, das für eine interne Ribosomenbindungsstelle (IRES) kodiert, aufweist.

Besonders bevorzugt weist dieses Konstrukt den Synapsin I-Promotor der Ratte (nachstehend als "synp" bezeichnet) als hochspezifisches Werkzeug zur rein neuronalen Expression eines unter seiner Kontrolle stehenden, in 3'-Richtung stromabwärts befindlichen DNA-Strukturgens, das komplette, genomische v-Ha-ras Strukturgen des Menschen (nachstehend mit "ras" bezeichnet) in 3'-Richtung stromabwärts des synp-Promotors, ein Reportergen, vorzugsweise das bekannte lacZ-Gen, mit dem der Nachweis der Expression von aktivem Ras-Protein ermöglicht wird, wobei dem Reportergen in 5'-Richtung stromaufwärts ein Gen für die interne Ribosomenbindungsstelle (IRES) vorgeschaltet ist, auf.

Es versteht sich, daß unter den erfindungsgemäß verwandten Begriffen Promotor, Kontrollelement, Struktur-Onkogen, Reportergen und DNA-Konstrukt und -Fragment sowohl die vollständigen Sequenzen, wie sie

vom ras-Strukturgen kodierte Ras-Protein durch die rein neuronale Kontrolle des synp-Promotors ausschließlich in neuronalen Zellen exprimiert werden. Ferner wird die vom lacZ-Gen kodierte  $\beta$ -Galaktosidase durch Einwirkung der IRES koexprimiert, so daß durch  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität und der damit verbundenen Farbreaktion diejenigen neuronalen Populationen, in denen aktives Ras-Protein exprimiert wird, identifiziert werden können.

Der synp-Promotor bietet also den Vorteil, die Wirkung eines beliebigen Proteins auf Nervenzellen zu untersuchen. Da die Expression des Proteins somit hochspezifisch nur in Nervenzellen durchgeführt wird, ist es möglich, eine Population von Neuronen zu erzeugen, die homogen in ihrem Genom das aktive ras-Strukturgen integriert haben und dieses konstitutiv exprimieren. Diese Expression geschieht unabhängig vom Typ der neuronalen Zellen, was nach dem Stand der Technik bisher unmöglich war.

Anstelle des synp-Promotors der Ratte können naturgemäß auch andere neuronalspezifische Promotoren oder Kontrollelemente verwandt werden, insbesondere auch synp-Promotoren des Menschen und andere Säugetiere, beispielsweise der Maus.

Das ras-Struktur-Onkogen kodiert für aktives Ras-Protein. Es enthält im 12. Triplett gegenüber dem Wildtypgen eine G-T-Punktmutation, die auf Aminosäureebene einen Glycin-Valin-Austausch bedingt. Dies hat zur Folge, daß die Tertiärkonformation des Proteins in der aktiven, GTP-gebundenen Form eingefroren wird, so daß GTP nicht mehr hydrolysierbar ist und so permanent ein neurotrophes Signal unabhängig von der Aktivierung des Austauschfaktors weitergeleitet wird.

Dies bietet erfindungsgemäß den Vorteil, daß neuronale Populationen, deren neurotrophe Faktoren ihr Überlebenssignal über Ras/GTP weiterleiten, somit von diesen Faktoren unabhängig sind, wenn in ihnen aktives Ras-Protein exprimiert wird. In diesen Populationen findet demzufolge während des ontogenetischen Zeitraumes ihrer Abhängigkeit von neurotrophen Faktoren kein neuronaler Zelltod statt.

Alternativ können andere Onkogene verwandt werden, deren Proteine eine Rolle in neuronalen Zellen spielen. Insbesondere sind dies andere ras-Onkogene, wie N-ras oder Ki-ras in allen ihren Varianten sowie Naras in seinen von der Val 12-Variante abweichenden Varianten, beispielsweise mit einer Abweichung im 50. Triplett.

Durch die Integration des Konstruktes in das Genom der befruchteten Eizelle des werdenden Tieres ist gewährleistet, daß in sämtlichen Neuronen aller Populationen sowohl des zentralen, als auch des peripheren Nervensystems des erwachsenen Tieres das Konstrukt vorhanden ist und exprimiert wird, da es an die Genome aller Körperzellen mitotisch weitergegeben wird. Damit stehen im adulten Tier sämtliche neuronalen Subtypen zur Erforschung der Wirkung von aktivem Ras-Protein zur Verfügung.

Ein weiterer Vorteil besteht darin, daß die beobachteten Effekte durch das Einbringen in das Genom eines nichthumanen Säugetieres in vivo verifiziert werden können, so daß Ergebnisse erhalten werden, die für einen ganzheitlichen Organismus gültig sind, wodurch die Bereitstellung des erfindungsgemäßen DNA-Fragments

erfindungsgemäß durch die Integration in das Genom eines nichthumanen Säugetieres in vivo verifiziert werden können, so daß Ergebnisse erhalten werden, die für einen ganzheitlichen Organismus gültig sind, wodurch die Bereitstellung des erfindungsgemäßen DNA-Fragments

Durch diese Konstruktion kann insbesondere das

erfindungsgemäß durch die Integration in das Genom eines nichthumanen Säugetieres in vivo verifiziert werden können, so daß Ergebnisse erhalten werden, die für einen ganzheitlichen Organismus gültig sind, wodurch die Bereitstellung des erfindungsgemäßen DNA-Fragments

möglich ist, die Expression von Ras-Protein sowohl vom Ort als auch von ihrer Stärke abzuschätzen, in dem man sie mit der Signalintensität der durch das Reportermolekül ausgelösten Farbreaktion korreliert. Hierdurch wird wesentlich die Auswahl einer bestimmten transgenen Linie oder bestimmter neuronaler Strukturen mit erhöhter Überlebensfähigkeit, die man auf Ras-Effekte hin untersuchen will, erleichtert.

Die Erfindung wird durch die folgende eingehende Beschreibung mit Bezug auf die folgenden Figuren deutlicher.

Fig. 1 zeigt schematisch die Klonierungsstrategie zur Herstellung des erfindungsgemäßen DNA-Konstrukts.

Fig. 2 zeigt maßstabgerecht den Anteil der DNA-Elemente am Gesamthaushalt einschließlich einer Eingangssequenz von 2,9 kpb. Die Eingangssequenz ist ohne Bedeutung für die Aktivität und Spezifität des Promotors an sich, kann aber einen Einfluß auf das Ausmaß der Aktivität haben.

Fig. 3 zeigt die DNA-Sequenz des erfindungsgemäßen DNA-Konstrukts.

Nach einer Ausführungsform der Erfindung wird nun das Verfahren zur Herstellung des erfindungsgemäßen DNA-Fragmentes mit Bezug auf Fig. 1 beschrieben.

Zur Herstellung wurden fünf verschiedene Vektoren benutzt:

1. pBluescript SK<sup>-</sup> mit der Insertion des Synapsin 1-Promotors der Ratte in 5'-3'-Richtung zwischen den SalI- und BamHI-Stellen (ohne Synapsin-Startkodon) = SK<sup>-</sup>-syn (Dr. M. W. Kilimann, Inst. f. Physiol. Chemie, Ruhr-Universität Bochum, Deutschland).
2. pBluescript SK<sup>-</sup> mit der Insertion des kompletten genomischen v-Ha-ras-Strukturgenes des Menschen in der BamHI-Stelle = SK<sup>-</sup>-ras (R. Jaggi, Inselspital Bern, Schweiz).
3. pBluescript SK<sup>+</sup> = SK<sup>+</sup>.
4. pBR322 (Fa. Stratagene, Heidelberg).
5. p1726, das das IRES des Enzephalomyokarditisvirus und das hierzu richtig orientierte komplette lacZ-Strukturgen von E.coli enthält (J. Majors, Washington Univ. School of Medicine, St. Louis, Miss. USA).

Zur Erzeugung des in Fig. 1 gezeigten Vektors 6 wurde der SK<sup>-</sup>-syn-Vektor mit der Restriktionsendonuklease BamHI geschnitten und damit das Ende des Synapsinpromotors im 5'-nichttranslatierten Bereich geöffnet. Der SK<sup>-</sup>-ras-Vektor 2 wurde ebenfalls mit BamHI geschnitten, wodurch das ras-Strukturgen von dem mit ihm verbundenen Vektor SK befreit wurde.

Das ras-Strukturgen wurde mit dem geöffneten SK<sup>-</sup>-syn-Vektor ligiert und die korrekte Orientierung des Strukturgens durch Sequenzierung des Überganges Promotor/Strukturgen verifiziert, wodurch sich Vektor SK<sup>-</sup>-syn-ras 6 ergab. Anschließend wurde Vektor 6 mit der Restriktionsendonuklease NotI verdaut, wodurch die meisten genomischen ras-Sequenzen in 3'-Richtung stromabwärts des Stoppkodons einschließlich der Polyadenylierungsstelle entfernt wurden. Der geöffnete Vektor (6) war somit bereit zur Aufnahme des IRES/lacZ-Fragments, dessen Enden zu den durch NotI generierten Schnittstellen kohäsiv sein mußten. Die ent-

(6) wurde folgende Klonierungsstrategie angewandt:

Das DNA-Plasmid p1726 5, das das IRES/lacZ-Fragment innerhalb zweier xbaI-Schnittstelle eingefügt besaß, wurde mit der Restriktionsendonuklease XbaI geschnitten, wodurch das IRES/lacZ-Fragment von mit ihm verbundenen Plasmidsequenzen befreit wurde. Das DNA-Plasmid pBluescriptSK<sup>+</sup> wurde mit XbaI geöffnet und mit dem IRES/lacZ-Fragment ligiert. Die korrekte Orientierung von IRES in Nachbarschaft zu der bereits vorhandenen XmaII-Schnittstelle wurde durch eine Restriktionsanalyse verifiziert. Um auf der anderen Seite des IRES/lacZ-Fragments eine weitere xmaII-Schnittstelle zu erhalten, wurde das DNA-Plasmid pBR322 (Vektor 4 in Fig. 1) einem NruI/BamHI-Doppelverdau unterzogen und das entstandene, eine XmaI-Schnittstelle enthaltende Fragment zwischen die Plasmidschnittstellen SmaI und BamHI unter Erzeugung des Vektors 3 einligiert. Durch einen XmaII-Verdau ließ sich auf diese Weise das IRES/lacZ-Fragment zurückgewinnen. Es wurde in den geöffneten Vektor 6 unter Erzeugung des in Fig. 1 gezeigten Vektors 7 eingefügt, und die korrekte Orientierung von IRES in Nachbarschaft des ras-Strukturgens wurde durch eine Restriktionsanalyse verifiziert. Um die für die Injektion in Zygoten geeignete DNA zu erhalten, mußten vorher alle Vektorsequenzen entfernt werden. Dies ließ sich durch einen Verdau von Vektor 7 mit XhoI erreichen, durch den man das gebrauchsfertige linearisierte DNA-Konstrukt erhielt, das in Fig. 2 komplett und in Fig. 3 in seinen wesentlichen Bestandteilen dargestellt ist.

Die Einbringung dieses DNA-Fragmentes in das Genom eines nicht humanen Tieres geschah mit dem Fachmann bekannten Techniken.

Die Herstellung erfolgte nach Standardtechniken, wie sie im einzelnen von Brigid Hogan, Frank Costantini und Elizabeth Lacy in dem Laborhandbuch "Manipulating the Mouse Embryo", Cold Spring Harbor Laboratory, 1986, beschrieben werden:

- hormonelle Stimulation der Oozyten-Donoren zwecks Super- und Zwangsovulation;
- Befruchtung der Oozyten durch Zusammensetzen der Donoren mit Böcken;
- Entnahme der Zygoten nach Tötung der Donoren;
- Injektion der DNA-Lösung in einen der beiden Vorkerne einer Zygote;
- Zusammensetzen der Zygoten-Rezipienten mit vasektomierten Böcken zur Identifikation empfängnisbereiter Tiere;
- Transfer der injizierten Zygoten in die Ampulla betäubter empfängnisbereiter Rezipienten;
- Zucht und Identifikation transgener Nachkommen.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung wird das erfindungsgemäße DNA-Konstrukt in einem Test-Verfahren zur Bestimmung neuronaler Schädigung verwendet. Gemäß diesem Verfahren wird ein Säugetier, etwa eine Maus oder eine Ratte, in dessen Genom das erfindungsgemäße DNA-Fragment eingebracht wurde, der Wirkung einer Substanz mit Verdacht auf neuronenschädigende Wirkung ausgesetzt. Das Ausmaß der Schädigung bzw. Zerstörung der neuronalen Zellen in diesem Versuchstier wird mit dem Zustand

des Kontrolltieres verglichen.

Die Erfindung wird nun anhand eines Beispiels

Zur Integration des IRES/lacZ-Fragments in Vektor

des Vektors 6 bestimmt werden kann. Es ist ein besonderes Vorzeichen, daß die

auf neuronenschädigende Wirkung spezifisch und in viel kleineren Mengen als bisher prüfen zu können.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung wird die Herstellung neuronaler Zellkulturen ermöglicht, deren Zellen das erfindungsgemäße DNA-Fragment homogen enthalten. Es ist ein Vorteil dieses Verfahrens, mit dieser Zellkulturen die spezifische Wirkung des erfindungsgemäßen Strukturgens auf neuronale Zellen zu untersuchen. So können Versuche in vitro durchgeführt werden, die im Versuchstier nicht möglich wären oder durch die das Versuchstier unerwünschten Beeinträchtigungen ausgesetzt wäre.

sion des Proteinproduktes des Reportergens Expressionseigenschaften des Struktur-Onkogens überprüft werden können.

12. Neuronale Zelle, dadurch gekennzeichnet, daß sie das DNA-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 11 enthält.

13. Verwendung des DNA-Konstrukts nach einem der Ansprüche 1 bis 11 oder der Zelle nach Anspruch 12 zum Testen von Wirkstoffen auf neuronalspezifische Aktivität.

Hierzu 10 Seite(n) Zeichnungen

#### Patentansprüche

1. Rekombiniertes, neuronalspezifisch aktiviertes, transkribierbares, lineares DNA-Konstrukt, **gekennzeichnet durch:**
  - ein neuronalspezifisches DNA-Kontrollelement zur Transcriptionsinitiation eines in 3'-Richtung stromabwärts befindlichen Strukturgens;
  - ein transkribierbares, eukaryotisches Struktur-Onkogen, das in 3'-Richtung stromabwärts zum neuronalspezifischen DNA-Kontrollelement eingefügt ist, und
  - ggf. ein in 3'-Richtung stromabwärts des Strukturgens eingefügtes Konstrukt, bestehend aus einem transkribierbaren Reportergen, gekoppelt mit einem in 5'-Richtung stromaufwärts eingefügten DNA-Fragment, das für eine optimale Ribosomenbindungsstelle (IRES) kodiert.
2. DNA-Konstrukt nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das neuronalspezifische DNA-Kontrollelement ein Synapsin I-Promotor, insbesondere der Ratte ist.
3. DNA-Konstrukt nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Struktur-Onkogen ein ras-Onkogen ist.
4. DNA-Konstrukt nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Struktur-Onkogen das komplette, genomische v-Ha-ras-Strukturgen des Menschen ist.
5. DNA-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Reportergen für  $\beta$ -Galactosidase kodiert.
6. DNA-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß zur Herstellung des DNA-Konstrukts Plasmide verwendet werden, ausgewählt aus pBluescriptSK<sup>-</sup>, pBluescriptSK<sup>+</sup>, pBR322 und p1726.
7. DNA-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß es in Zygoten eingebracht wird.
8. DNA-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß es in somatische Zellen eingebracht wird.
9. DNA-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß das vom Struktur-Onkogen kodierte aktive Protein im Genom des transgenen, nichthumanen Säugetiers konstitutiv exprimiert wird.
10. DNA-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Produkt des Struktur-Onkogens eine Kontrolle des neuronalen Wachstums darstellt.
11. DNA-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Produkt des Struktur-Onkogens eine Kontrolle des neuronalen Wachstums darstellt.

- Leerseite -

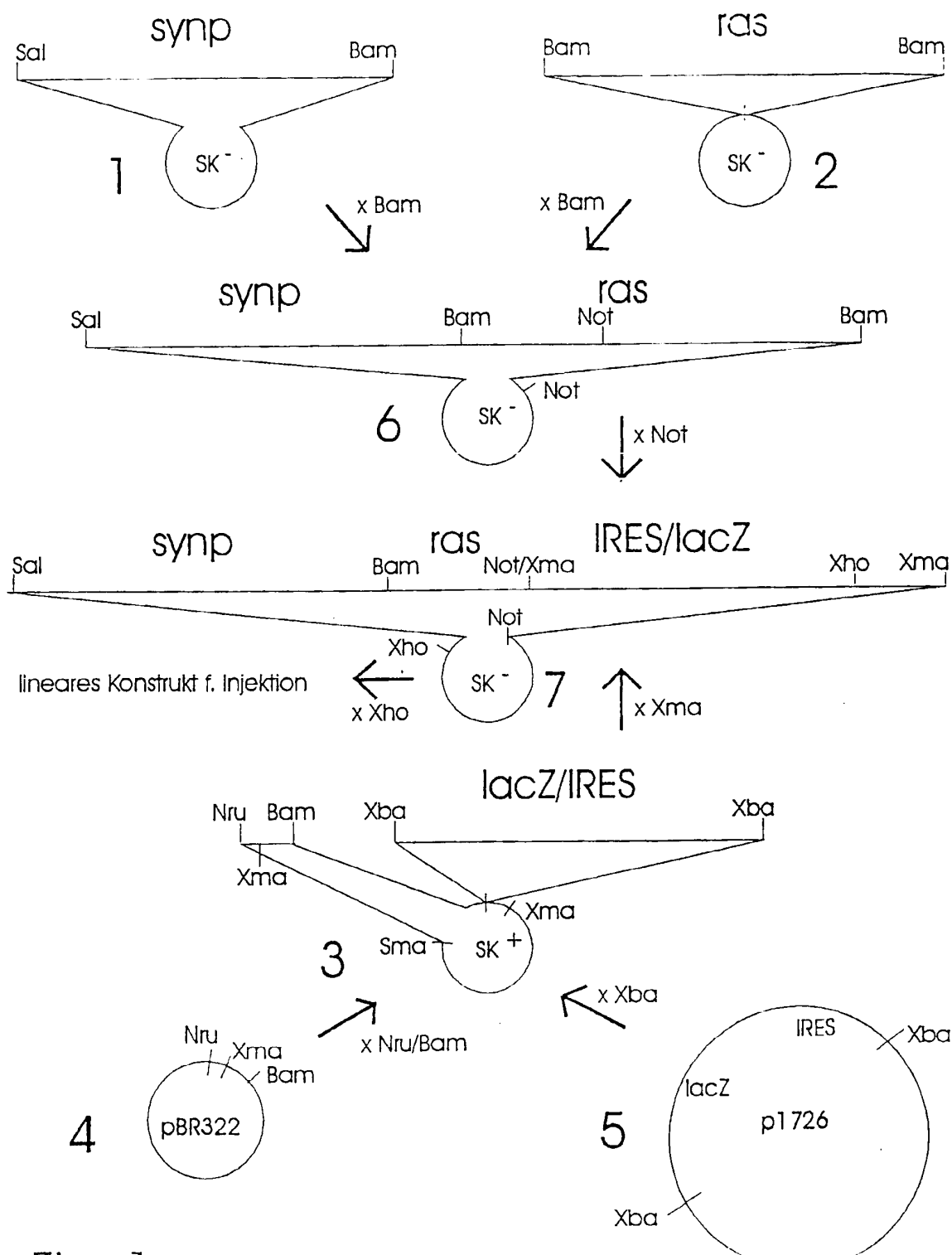


Fig. 1

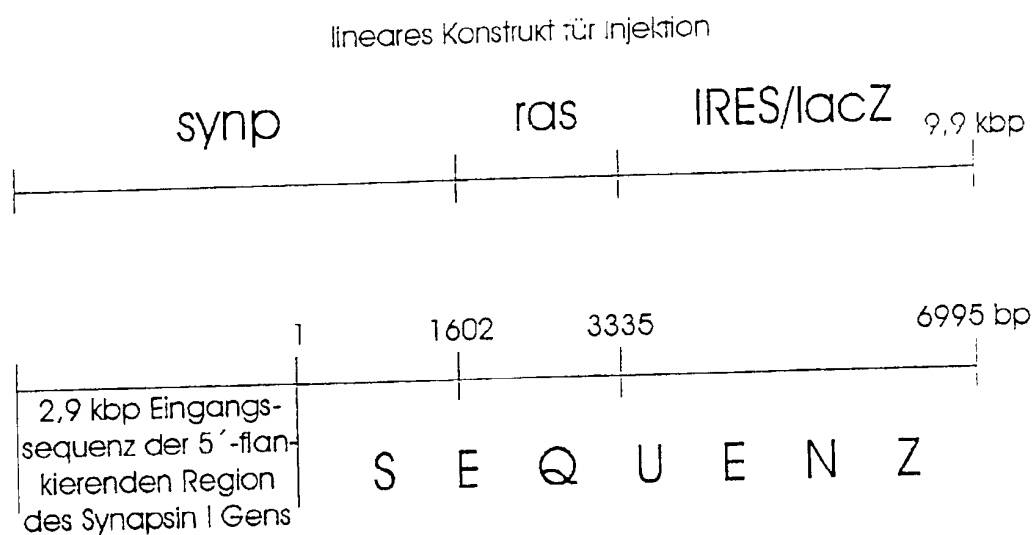


Fig. 2



Figur 3

1 ACCATCACCA AGGCAATTCT CATTTAAAAA AAAAACATTT AATTGGGGGC TTTCTTACAG  
 TGGTAGTGGT TCCGTTAAGA GTAAATTTTT TTTTGTAAA TTAACCCCG AAAGAATGTC  
 Synapsin - Promotor ---->

61 TTTCAGAGAT GAGTCACTTA GCACCATGAT GGAGAATAIG GTGGCAGACA CTGGCTTGAT  
 AAAGTCTCTA CTCAGTGAAT CGTGGTACTA CCTCTTATAC CACCGTCTGT GACCGAACTA

121 GCTGGAGACA TAGCTGAGAG CTGCATGCTG ATCCACAGGC AACACAGACA GACAGACAGA  
 CGACCTCTGT ATCGACTCTC GACGTACGAC TAGGTGTCCG TTGTGTCTGT CTGTCTGTCT

181 CAGACAGACA GACAGACTGA CTGACTAACT GACTGACTCT GGGCTTGGCG TGGGTTTTTG  
 GTCTGTCTGT CTGTCTGACT GACTGATTGA CTGACTGAGA CCCGAACCGC ACCCAAAAAAC

241 AACCCCCAAA GCCCACCCCA TAGACATGCT TCCTCCAACA AGGTCACATA TCCTAATCCT  
 TTGGGGGTTT CGGGTGGGGT ATCTGTACGA AGGAGGTTGT TCCAGTGTAT AGGATTAGGA

301 TTTAATCATT CCCAACAGTG CCACTCCCTT GTGACTAAGC ATTCAAATAT ATGAACCTTC  
 AAATTAGTAA GGGTTGTTCAC GGTGAGGGAA CACTGATTCT TAAGTTTATA TACTTGGAAG

361 TTATTCAGAC CACCAAAATT ACATTATTCT TTCATATATA TGTATTAACT GGCCTCCTGT  
 AATAAGTCTG GTGGTTTTAA TGTAATAAGA AAGTATATAT ACATAATTGA CCGGAGGACA

421 CTGCAAAGTT CTTATACACG GAGGGAGACA TCTATGAACA CTGATTACAC TGGGTTTTGG  
 GACGTTTCAA GAATATGTGC CTCCCTCTGT AGATACTTGT GACTAATGTG ACCCAAAACC

481 CTACGTCCAG AGCAGAGGAA TGAGGGCATG TAGACTAAAT ATGTTCTGTG GGAAGAGGCT  
 GATGCAGGTC TCGTCTCCTT ACTCCCGTAC ATCTGATTTA TACAAGCACA CCTTCTCCGA

541 GAATACACAT CAGAGTTACT GCTGCAGGAA ATGCTTCTGC ATTGCATACC CAGAGTTTCC  
 CTTATGTGTA GTCTCAATGA CGACGTCCTT TACGAAGACG TAACGTATGG GTCTCAAAGG

601 TTGCTCATCT GAGAGCATGT GTTTTTTCCA GATGTGTGTA CTTGTGTGAG ATTCTCTGGG  
 AACGAGTAGA CTCTCGTACA CAAAAAAGGT CTACACACAT GAACACACTC TAAGAGACCC

661 TGTGTGTCAA TGTGTTGCCT GAACGTGCAT TGCTCAATAT GCTCATGTGT GTTACCCTGG  
 ACACACAGTT ACACAACGGA CTTGCACGTA ACGAGTTATA CGAGTACACA CAATGGGACC

721 GCTTGTACAT CTACATATAT ACCTGGATGC CCGTGTGTTT TGTGATGTAC ATATACCCTG  
 CGAACATGTA GATGTATATA TGGACCTACG GGCACACAAG AACTACATG TATATGGGAC

781 TGTCAATCCT TGTTTTTCTA TTTGTGTTAT TCCATGTGTT CCTTCAGGCT CTCACTACCC  
 ACAGTAAGGA ACAAAAAGAT AAACACAATA AGGTACACAA GGAAGTCCGA GAGTGATGGG

841 AAGTGTCCAC CTCCGCCTGT CTGGTGATGT TTACGCTACC CCGTGTCTTT TTCTTTGCCT  
 TTCACAGGTG GAGGCGGACA GACCACTACA AATGCGATGG GGCACGAGAA AAGAAACGGA

Figur 3

961 TTATGTTCCC CTCCGAGTAT GCTTCTATCC CGACCCCTCAA CCCCCAAATG CCTTCAGAGG  
 AATACAAGGG GAGGCTCATA CGAAGATAGG GCTGGGAGTT GGGGTTTTAC GGAAGTCTCC

1021 TGAAAATCAA CACTGGAAAC ACAAGTATCT GGAAGGGTA ACAATGCAAG TTAGCCTGAG  
 ACTTTTAGTT GTGACCTTTG TGTTCATAGA CCCTTCCCAT TGTTACGTTT AATCGGACTC

1081 GATTTAGGAG GAGGCTGAAA AACAGAGTAG GAGCCTTACT ACGGGTCCAG ACCCTACGGA  
 CTAAATCCTC CTCCGACTTT TTGTCTCATC CTCGGAATGA TGCCACAGTC TGGGATGCCT

1141 CAAGAACCCC CACTCCCACT CCCCCAATTG CGCATTCCTT CCCCCATCAG AGGGGGAGGG  
 GTTCTTGGGG GTGAGGGTGA GGGGTTTAAAC GCGTAAGGGA GGGGGTAGTC TCCCCCTCCC

1201 GAAGAGGATG CAGCGCGGCG CGGCGCGTGC GCACTGTCGG ATTTAGTACC GCGGACAGAG  
 CTTCTCCTAC GTCGCGCCGC GCCGCGCAGC CGTGACAGCC TAAATCATGG CGCCTGTCTC

1261 CCTTCGCCCC CGCTGCCGGC GCGCGCCACC ACCTCCCCAG CACCAAAGGC GGGCTGACGT  
 GGAAGCGGGG GCGACGGCCG CGCGCGGTGG TGGAGGGGTC GTGGTTTCCG CCGGACTGCA

1321 CACTCTCCAG CCCTCCCCAA ACTCCCCTAC CTCACCGCCT TGGTCGCGTC CGTGACAGCG  
 GTGAGAGGTC GGGAGGGGTT TGAGGGGATG GAGTGGCGGA ACCAGCGCAG GCACGTGCGC

1381 TGAGTCCAGT CGGGCCGCAC CACAAGAGGT GCAAGATAGG GGGGTGCAGG CGCGACCATA  
 ACTCAGGTCA GCGCGGCGTG GTGTTCTCCA CGTTCTATCC CCCCACGTCC GCGCTGGTAT

1441 CGCTCTGCGG CGGCAGAGCC TCAGCGCTGC CTCAGTCTGC AGCGGGCAGC AGAGGAGTCG  
 GCGAGACGCC GCCGTCTCGG AGTCGCGACG GAGTCAGACG TCGCCCGTCG TCTCCTCAGC

1501 CGTCGTGCCA GAGAGCGCCG CCGTGCTCCT GAGCCCCTTG CGCTCCGCCC CCGCGGCCCA  
 GCAGCACGGT CTCTCGCGGC GGCACGAGGA CTCGGGGAAC GCGAGGCGGG GCGCGCGGGT

1561 CCGACCCACT GCCCCCTTGA TCCGGGGCCG CATGAGGAGC GATGACGGAA TATAAGCTGG  
 GGCTGGGTGA CGGGGAACCT AGGCCCCGGC GTACTCCTCG CTACTGCCTT ATATTCGACC  
 ras - Strukturgen --

1621 TGGTGGTGGG CGCCGTCTGT GTGGGCAAGA GTGCGCTGAC CATCCAGCTG ATCCAGAAC  
 ACCACCACCC GCGGCAGCCA CACCCGTTCT CACGCGACTG GTAGGTGAC TAGGTCTTGG  
 --->

1681 ATTTTGTGGA CGAATACGAC CCCACTATAG AGGTGAGCCT GCGGCCACCG TCCAGGTGCC  
 TAAAACACCT GCTTATGCTG GGGTGATATC TCCACTCGGA CCGCGGTGGC AGGTCCACGG

1741 AGCAGCTGCT GCGGGCGAGC CCAGGACACA GCCAGGATAG GGCTGGCTGC AGCCCCCTGGT  
 TCGTCGACGA CGCCCGCTCG GGTCTGTGT CGGTCTATC CCGACCGACG TCGGGGACCA

1801 CCCCTGCATG GTGCTGTGGC CCTGTCTCCT GCTTCCTCTA GAGGAGGGGA GTCCCTCGTC  
 GGGGACGTAC CACGACACCG GGACAGAGGA CGAAGGAGAT CTCCTCCCTT CAGGGAGCAG

## Figur 3

1921 TGTGTGAACT CCCCCACGG AAGGTCTCTGA GGGGGTCCCT GAGCCCTGTC CTCCTGCAGG  
ACACACTTGA GGGGGGTGCC TTCCAGGACT CCCCAGGGA CTCGGGACAG GAGGACGTCC

1981 ATTCCTACCG GAAGCAGGTG GTCATTGATG GGGAGACGTG CCTGTTGGAC ATCCTGGATA  
TAAGGATGGC CTTCGTCCAC CAGTAACTAC CCCTCTGCAC GGACAACCTG TAGGACCTAT

2041 CCGCCGGCCA GGAGGAGTAC AGCGCCATGC GGGACCAGTA CATGCGCACC GGGGAGGGCT  
GGCGGCCGGT CCTCCTCATG TCGCGGTACG CCCTGGTCAT GTACGCGTGG CCCCTCCCGA

2101 TCCTGTGTGT GTTTGCCATC AACAAACACCA AGTCTTTTGA GGACATCCAC CAGTACAGGT  
AGGACACACA CAAACGGTAG TTGTTGTGGT TCAGAAAACCT CCTGTAGGTG GTCATGTCCA

2161 GAACCCCGTG AGGCTGGCCC GGGAGCCAC GCGGCACAGG TGGGGCCAGG CCGGCTGCGT  
CTTGGGGCAC TCCGACCGGG CCCTCGGGTG CGGCGTGTCC ACCCGGTCC GGCCGACGCA

2221 CCAGGCAGGG GCCTCCTGTC CTCTCTGCGC ATGTCCTGGA TGCCGCTGCG CCTGCAGCCC  
GGTCCGTCCC CGGAGGACAG GAGAGACGCG TACAGGACCT ACGGCGACGC GGACGTCCGG

2281 CCGTAGCCAG CTCTCGCTTT CCACCTCTCA GGGAGCAGAT CAAACGGGTG AAGGACTCGG  
GGCATCGGTC GAGAGCGAAA GGTGGAGAGT CCCTCGTCTA GTTTGCCAC TTCCTGAGCC

2341 ATGACGTGCC CATGGTGCTG GTGGGGAACA AGTGTGACCT GGCTGCACGC ACTGTGGAAT  
TACTGCACGG GTACCACGAC CACCCCTTGT TCACACTGGA CCGACGTGCG TGACACCTTA

2401 CTCGGCAGGC TCAGGACCTC GCGGAAGCT ACGGCATCCC CTACATCGAG ACCTCGGCCA  
GAGCCGTCCG AGTCCTGGAG CGGGCTTCGA TGCCGTAGGG GATGTAGCTC TGGAGCCGGT

2461 AGACCCGGCA GGTGAGGCAG CTCTCCACCC CACAGCTAGC CAGGGACCCG CCCC GCCCGG  
TCTGGGCCGT CCACTCCGTC GAGAGGTGGG GTGTCGATCG GTCCCTGGGC GGGGCGGGGC

2521 CCCCAGCCAG GGAGCAGCAC TCACTGACCC TCTCCCTTGA CACAGGGCAG CCGCTCTGGC  
GGGGTCGGTC CCTCGTCGTG AGTGA CTGGG AGAGGGA ACT GTGTCCCGTC GGCGAGACCG

2581 TCTAGCTCCA GCTCCGGGAC CCTCTGGGAC CCCCCGGGAC CCATGTGACC CAGCGGCCCC  
AGATCGAGGT CGAGGCCCTG GGAGACCCTG GGGGGCCCTG GGTACACTGG GTCGCCGGGG

2641 TCGCGCTGTA AGTCTCCCGG GACGGCAGGG CAGTGAGGGA GGCGAGGGCC GGGGTCTGGG  
AGCGCGACAT TCAGAGGGCC CTGCCGTCCC GTCACTCCCT CCGCTCCCGG CCCCAGACCC

2701 CTCACGCCCT GCAGTCCTGG GCCGACACAG CTCGGGGGAA GGCGGAGGTC CTTGGGGAGA  
GAGTGCGGGA CGTCAGGACC CGGCTGTGTC GAGGCCCTT CCGCTCCAG GAACCCCTCT

2761 GCTGCCCTGA GCCAGGCCGG AGCGGTGACC CTGGGGGCCG GCCCCCTTTG TCCCCAGAGT  
CGACGGGACT CGGTCCGGCC TCGCCACTGG GACCCCGGGC CGGGGAGAAC AGGGGTCTCA

Figur 3

2881 CTGAGTCGAG AGCTGGGTGC AGGGTGGTCA AACCCCTGGCC AGACCTGGAG TTCAGGAGGG  
 GACTCAGCTC TCGACCCACG TCCCACCACT TTGGGACCGG TCTGGACCTC AAGTCTCTCC

2941 CCCCCGGGCCA CCCTGACCTT TGAGGGGGCTG CTGTAGCATG ATGCGGGTGG CCCTGGGCAC  
 GGGGCCCCGGT GGGACTGGAA ACTCCCCGAC GACATCGTAC TACGCCCACC GGGACCCGTG

3001 TTCGAGATGG CCAGAGTCCA GCTTCCCGTG TGTGTGGTGG GCCTGGGGAA GTGGCTGGTG  
 AAGCTCTACC GGTCTCAGGT CGAAGGGCAC ACACACCACC CGGACCCCTT CACCGACCAC

3061 GAGTCGGGAG CTTGGGGCCA GGCAAGGCTT GATCCACAG CAGGGAGCCC CTCACCCAGG  
 CTCAGCCCTC GAAGCCCCGT CCGTTCCGAA CTAGGGTGTC GTCCCTCGGG GAGTGGGTCC

3121 CAGGCGGCCA CAGGCCGGTC CCTCCTGATC CCATCCCTCC TTTCCAGGG AGTGGAGGAT  
 GTCCGCCGGT GTCCGGCCAG GGAGGACTAG GGTAGGGAGG AAAGGGTCCC TCACCTCCTA

3181 GCCTTCTACA CGTTGGTGCG TGAGATCCGG CAGCACAAGC TGCGGAAGCT GAACCCCTCT  
 CGGAAGATGT GCAACCACGC ACTCTAGGCC GTCGTGTTCT ACGCCTTCGA CTTGGGAGGA

3241 GATGAGAGTG GCCCCGGCTG CATGAGCTGC AAGTGTGTGC TCTCCTGACG CAGGTGAGGG  
 CTACTCTCAC CGGGGCCGAC GTACTCGACG TTCACACACG AGAGGACTGC GTCCACTCCC  
 Stopp

3301 GGAATCCCAG GGCGGCCGCT CTAGAGGAAT TCCGCCCCTC TCCCTCCCCC CCCCCTAACG  
 CCTGAGGGTC CCGCCGGCGA GATCTCCTTA AGGCGGGGAG AGGGAGGGGG GGGGGATTGC  
 Internal Ribosomal Entry

3361 TTAATGGCCG AAGCCGCTTG GAATAAGGCC GGTGTGCGTT TGTCTATATG TTATTTTCCA  
 AATGACCGGC TTCGGCGAAC CTTATTCCGG CCACACGCAA ACAGATATAC AATAAAAGGT  
 Site ---->

3421 CCATATTGCC GTCTTTTGGC AATGTGAGGG CCCGGAAACC TGGCCCTGTC TTCTTGACGA  
 GGTATAACGG CAGAAAACCG TTACTCTCC GGGCCTTTGG ACCGGGACAG AAGAACTGCT

3481 GCATTCTTAG GGGTCTTTCC CCTCTCGCCA AAGGAATGCA AGGTCTGTTG AATGTCGTGA  
 CGTAAGGATC CCCAGAAAGG GGAGAGCGGT TTCCTTACGT TCCAGACAAC TTACAGCACT

3541 AGGAAGCAGT TCCTCTGGAA GCTTCTTGAA GACAAACAAC GTCTGTAGCG ACCCTTTGCA  
 TCCTTCGTCA AGGAGACCTT CGAAGAACTT CTGTTTGTG CAGACATCGC TGGGAAACGT

3601 GGCAGCGGAA CCCCCACCT GGCACAGGT GCCTCTGCGG CCAAAAGCCA CGTGATAAAG  
 CCGTCGCCTT GGGGGGTGGA CCGCTGTCCA CGGAGACGCC GGTTCCTGGT GCACATATTC

3661 ATACACCTGC AAAGGCGGCA CAACCCAGT GCCACGTTGT GAGTTGGATA GTTGTGGAAA  
 TATGTGGACG TTTCCGCCGT GTTGGGGTCA CGGTGCAACA CTCAACCTAT CAACACCTTT

3721 GAGTCAAATG GCTCTCCTCA AGCGTATTCA ACAAGGGGCT GAAGGATGCC CAGAAGGTAC  
 CTCAGTTTAC CGAGAGGAGT TCGCATAAGT TGTTCCTCGA CTCCTACGG GTCTTCCATG

GGTAAACATA GGTAGACTA GACCCCGGAC GACCTCTA GAGTCTTCTA GAGTCTTCTA

Figur 3

3841 GGT T A A A A A A C G T C T A G G C C C C C G A A C C A C G G G G A C G T G G T T T C C T T T G A A A A A C A C G  
C C A A T T T T T T G C A G A T C C G G G G G C T T G G T G C C C C T G C A C A A A A G G A A A C T T T T T G T G C

3901 A T G A T A A G C T T G C C A C A A C C A T G A T T A C G G A T T C A C T G G C C G T C G T T T T A C A A C G T C G T G  
T A C T A T T C G A A C G G T G T T G G T A C T A A T G C C T A A G T G A C C G C A G C A A A A T G T T G C A G C A C  
lacZ - Strukturgen --->

3961 A C T G G G A A A A C C C T G G C G T T A C C C A A C T T A A T C G C C T T G C A G C A C A T C C C C C T T T C G C C A  
T G A C C C T T T T G G G A C C G C A A T G G G T T G A A T T A G C G G A A C G T C G T G T A G G G G G A A A G C G G T

4021 G C T G G C G T A A T A G C G A A G A G G C C C G C A C C G A T C G C C C T T C C A A C A G T T G C G C A G C C T G A  
C G A C C G C A T T A T C G C T T C T C G G G C G T G G C T A G C G G G A A G G G T T G T C A A C G C G T C G G A C T

4081 A T G G C G A A T G G C G C T T T G C C T G G T T T C C G G C A C C A G A A G C G G T G C C G G A A A G C T G G C T G G  
T A C C G C T T A C C G C G A A A C G G A C C A A A G G C C G T G G T C T T C G C C A C G G C C T T C G A C C G A C C

4141 A G T G C G A T C T T C C T G A G G C C G A T A C T G T C G T C G T C C C C T C A A A C T G G C A G A T G C A C G G T T  
T C A C G C T A G A A G G A C T C C G G C T A T G A C A G C A G C A G G G G A G T T T G A C C G T C T A C G T G C C A A

4201 A C G A T G C G C C C A T C T A C A C C A A C G T A A C C T A T C C C A T T A C G G T C A A T C C G C C G T T T G T T C  
T G C T A C G C G G G T A G A T G T G G T T G C A T T G G A T A G G G T A A T G C C A G T T A G G C G G C A A C A A G

4261 C C A C G G A G A A T C C G A C G G G T T G T T A C T C G C T C A C A T T T A A T G T T G A T G A A A G C T G G C T A C  
G G T G C C T C T T A G G C T G C C C A A C A A T G A G C G A G T G A A A T T A C A A C T A C T T T C G A C C G A T G

4321 A G G A A G G C C A G A C G C G A A T T A T T T T T G A T G G C G T T A A C T C G G C G T T T C A T C T G T G G T G C A  
T C C T T C C G G T C T G C G C T T A A T A A A A A C T A C C G C A A T T G A G C C G C A A A G T A G A C A C C A C G T

4381 A C G G G C G C T G G G T C G G T T A C G G C C A G G A G T C G T T T G C C G T C T G A A T T T G A C C T G A G C G  
T G C C C G C G A C C A G C C A A T G C C G G T C C T G T C A G C A A A C G G C A G A C T T A A A C T G G A C T C G C

4441 C A T T T T T T A C G C G C C G A G A A A A C C G C C T C G C G G T G A T G G T G C T G C G T T G G A G T G A C G G C A  
G T A A A A A T G C G C G C C T C T T T T G G C G G A G C G C C A C T A C C A C G A C G C A A C C T A C T G C C G T

4501 G T T A T C T G G A A G A T C A G G A T A T G T G G C G G A T G A G C G G C A T T T C C G T G A C G T C T C G T T G C  
C A A T A G A C C T T C T A G T C C T A T A C A C C G C C T A C T C G C C G T A A A A G G C A C T G C A G A G C A A C G

4561 T G C A T A A A C C G A C T A C A C A A A T C A G C G A T T T C C A T G T T G C C A C T C G C T T T A A T G A T G A T T  
A C G T A T T T G G C T G A T G T G T T T A G T C G C T A A A G G T A C A A C G G T G A G C G A A A T T A C T A C T A A

4621 T C A G C C G C G C T G T A C T G G A G G C T G A A G T T C A G A T G T G C G G C G A G T T G C G T G A C T A C C T A C  
A G T C G G C G C G A C A T G A C C T C G A C T T C A A G T C T A C A C G C C G C T C A A C G C A C T G A T G G A T G

4681 G G G T A A C A G T T T C T T T A T G G C A G G G T G A A A C G C A G G T C G C C A G C G G C A C C G C G C C T T T C G  
C C C A T T G T C A A A G A A A T A C C G T C C A C T T T G C G T C C A G C G G T C G C C G C G T G G C G C G G A A A G C

Figur 3

4801 TCGAAAACCC GAAACTGTGG AGCGCCGAAA TCCCGAATCT CTATCGTGCG GTGGTTGAAC  
AGCTTTTGGG CTTTGACACC TCGCGGCTTT AGGGCTTAGA GATAGCAGCG CACCAACTTG

4861 TGCACACCGC CGACGGCAGC CTGATTGAAG CAGAAGCCTG CGATGTCGGT TTCCGCGAGG  
ACGTGTGGCG GCTGCCGTGC GACTAACTTC GTCTTCGGAC GCTACAGCCA AAGGCGCTCC

4921 TCGCGATTGA AAATGGTCTG CTGCTGCTGA ACGGCAAGCC GTTGCTGATT CGAGGCGTTA  
ACGCCTAACT TTTACCAGAC GACGACGACT TGCCGTTCGG CAACGACTAA GCTCCGCAAT

4981 ACCGTCACGA GCATCATCCT CTGCATGGTC AGGTCATGGA TGAGCAGACG ATGGTGACAG  
TGGCAGTGCT CGTAGTAGGA GACGTACCAG TCCAGTACCT ACTCGTCTGC TACCACGTCC

5041 ATATCCTGCT GATGAAGCAG AACAACCTTTA ACGCCGTGCG CTGTTTCGCAT TATCCGAACC  
TATAGGACGA CTACTTCGTC TTGTTGAAAT TGCGGCACGC GACAAGCGTA ATAGGCTTGG

5101 ATCCGCTGTG GTACACGCTG TCGGACCGCT ACGGCCTGTA TGTGGTGGAT GAAGCCAATA  
TAGGCGACAC CATGTGCGAC ACGCTGGCGA TGCCGGACAT ACACCACCTA CTTCCGTTAT

5161 TTGAAACCCA CGGCATGGTG CCAATGAATC GTCTGACCGA TGATCCGCGC TGGCTACCGG  
AACTTTGGGT GCCGTACCAC GGTTACTTAG CAGACTGGCT ACTAGGCGCG ACCGATGGCC

5221 CGATGAGCGA ACGCGTAACG CGAATGGTGC AGCGCGATCG TAATCACCCG AGTGTGATCA  
GCTACTCGCT TGCGCATTGC GCTTACCACG TCGCGCTAGC ATTAGTGGGC TCACACTAGT

5281 TCTGGTCGCT GGGGAATGAA TCAGGCCACG GCGCTAATCA CGACGCGCTG TATCGCTGGA  
AGACCAGCGA CCCCTTACTT AGTCCGGTGC CGCGATTAGT GCTGCGCGAC ATAGCGACCT

5341 TCAAATCTGT CGATCCTTCC CGCCCGGTGC AGTATGAAGG CGGCGGAGCC GACACCACGG  
AGTTTAGACA GCTAGGAAGG GCGGGCCACG TCATACTTCC GCCGCCTCGG CTGTGGTGCC

5401 CCACCGATAT TATTTGCCCG ATGTACGCGC GCGTGGATGA AGACCAGCCC TTCCCGGCTG  
GGTGGCTATA ATAAACGGGC TACATGCGCG CGCACCTACT TCTGGTCGGG AAGGGCCGAC

5461 TGCCGAAATG GTCCATCAAA AAATGGCTTT CGCTACCTGG AGAGACGCGC CCGCTGATCC  
ACGGCTTTAC CAGGTAGTTT TTTACGAAA GCGATGGACC TCTCTGCGCG GGCGACTAGG

5521 TTTGCGAATA CGCCACGCG ATGGGTAACA GTCTTGGCGG TTTCGCTAAA TACTGGCAGG  
AAACGCTTAT GCGGGTGCGC TACCCATTGT CAGAACC GCCG

5581 CGTTTCGTCA GTATCCCGT TTACAGGGCG GCTTCGTCTG GGA

5641 TGATTAAATA TGATGAAAC GGCAACCCGT GGTGCGCTTA CGGCGGTGAT TTTGGCGATA  
ACTAATTTAT ACTACTTTTG CCGTTGGGCA CCAGCCGAAT GCCGCCACTA AAACCGCTAT

Figur 3

5761 CAGCGCTGAC GGAAGCAAAA CACCAGCAGC AGTTTTTCCA GTTCCGTTTA TCCGGGCAAA  
 GTCGCGACTG CCTTCGTTTT GTGGTCGTCG TCAAAAAGGT CAAGGCAAAT AGGCCCGTTT

5821 CCATCGAAGT GACCAGCGAA TACCTGTTCC GTCATAGCGA TAACGAGCTC CTGCACTGGA  
 GGTAGCTTCA CTGGTCGCTT ATGGACAAGG CAGTATCGCT ATTGCTCGAG GACGTGACCT

5881 TGGTGGCGCT GGATGGTAAG CCGCTGGCAA GCGGTGAAGT GCCTCTGGAT GTCGCTCCAC  
 ACCACCGCGA CCTACCATTG GCGGACCGTT CGCCACTTCA CGGAGACCTA CAGCGAGGTG

5941 AAGGTAAACA GTTGATTGAA CTGCCTGAAC TACCGCAGCC GGAGAGCGCC GGGCAACTCT  
 TTCCATTTGT CAACTAACTT GACGGACTTG ATGGCGTCGG CCTCTCGCGG CCCGTTGAGA

6001 GGCTCACAGT ACGCGTAGTG CAACCGAACG CGACCGCATG GTCAGAAGCC GGGCACATCA  
 CCGAGTGTCG TCGCATCACG GTTGGCTTGC GCTGGCGTAC CAGTCTTCGG CCCGTGTAGT

6061 GCGCCTGGCA GCAGTGGCGT CTGGCGGAAA ACCTCAGTGT GACGCTCCCC GCCGCGTCCC  
 CGCGGACCGT CGTCACCGCA GACCGCCTTT TGGAGTCACA CTGCGAGGGG CGGCGCAGGG

6121 ACGCCATCCC GCATCTGACC ACCAGCGAAA TGGATTTTTG CATCGAGCTG GGTAATAAGC  
 TGCGGTAGGG CGTAGACTGG TGGTCGCTTT ACCTAAAAAC GTAGCTCGAC CCATTATTG

6181 GTTGGCAATT TAACCGCCAG TCAGGCTTTC TTTCACAGAT GTGGATTGGC GATAAAAAAC  
 CAACCGTTAA ATTGGCGGTC AGTCCGAAAG AAAGTGTCTA CACCTAACCG CTATTTTTTG

6241 AACTGCTGAC GCCGCTGCGC GATCAGTTCA CCCGTGCACC GCTGGATAAC GACATTGGCG  
 TTGACGACTG CGGCGACGCG CTAGTCAAGT GGGCACGTGG CGACCTATTG CTGTAACCGC

6301 TAAGTGAAGC GACCCGCATT GACCCTAACG CCTGGGTCGA ACGCTGGAAG GCGGCGGGCC  
 ATTCACCTCG CTGGGCGTAA CTGGGATTGC GGACCCAGCT TGCGACCTTC CGCCGCCCCG

6361 ATTACCAGGC CGAAGCAGCG TTGTTGCAGT GCACGGCAGA TACACTTGCT GATGCGGTGC  
 TAATGGTCCG GCTTCGTCGC AACAACTGCA CGTGCCGTCT ATGTGAACGA CTACGCCACG

6421 TGATTACGAC CGCTCACGCG TGGCAGCATC AGGGGAAAAC CTTATTTATC AGCCGGAAAA  
 ACTAATGCTG GCGAGTGCGC ACCGTCGTAG TCCCCTTTTG GAATAAATAG TCGGCCTTTT

6481 CCTACCGGAT TGATGGTAGT GGTCAAATGG CGATTACCGT TGATGTTGAA GTGGCGAGCG  
 GGATGGCCTA ACTACCATCA CCAGTTTACC GCTAATGGCA ACTACAACCT CACCGCTCGC

6541 ATACACCGCA TCCGGCGCGG ATTGGCCTGA ACTGCCAGCT GGCGCAGGTA GCAGAGCGGG  
 TATGTGGCGT AGGCCGCGCC TAACCGGACT TGACGGTCGA CCGCGTCCAT CGTCTCGCCC

6601 TAAACTGGCT CGGATTAGGG CCGCAAGAAA ACTATCCCGA CCGCCTTACT GCCGCCTGTT  
 ATTTGACCGA GCCTAATCCC GCGGTTCTTT TGATAGGGCT GGCGGAATGA CGGCGGACAA

Figur 3

6721 ACGGTCTGCG CTGCGGGACG CGCGAATTGA ATTATGGCCC ACACCAGTGG CGCGGCGACT  
TGCCAGACGC GACGCCCTGC GCGCTTAACT TAATACCGGG TGTGGTCACC GCGCCGCTGA

6781 TCCAGTTCAA CATCAGCCGC TACAGTCAAC ACCACTGAT GGAAACCAGC CATCGCCATC  
AGGTCAAGTT GTAGTCGGCG ATGTCAGTTG TCGTTGACTA CCTTTGGTCG GTAGCGGTAG

6841 TGCTGCACGC GGAAGAAGGC ACATGGCTGA ATATCGACGG TTTCCATATG GGGATTGGTG  
ACGACGTGCG CCTTCTTCCG TGTACCGACT TATAGCTGCC AAAGGTATAC CCCTAACCAC

6901 GCGACGACTC CTGGAGCCCG TCAGTATCGG CGGAATTCCA GCTGAGCGCC GGTGCTTACC  
CGCTGCTGAG GACCTCGGGC AGTCATAGCC GCCTTAAGGT CCACTCGCGG CCAGCGATGG

6961 ATTACCAGTT GGTCTGGTGT CAAAAATAAT AATAA  
TAATGGTCAA CCAGACCACA GTTTTTATTA TTATT  
Stopp